

遊離および固定化サーモライシンによるペプチド生成

功刀 滋^{*}、森川良雄^{*}、野村哲士^{*}、北野博己^{**}

Peptide Synthesis by Free and Immobilized Thermolysin

Shigeru KUNUGI^{*}, Yoshio MORIKAWA^{*}, Akihiko NOMURA^{*}
and Hiromi KITANO^{**}

(Received Feb. 26, 1988)

Peptide synthesis was catalyzed by thermolysin in the free enzyme state and immobilized on porous glass beads by 3-aminopropyltriethoxysilane-glutaraldehyde method or on reactive latex particles. Factors affecting the hydrolytic activity and the yield of the peptide synthesis, such as substrate concentration, pH, temperature, organic solvent content and chemical modification were studied.

1. はじめに

プロテアーゼやペプチダーゼは、タンパク質やポリペプチドの加水分解反応を触媒する酵素であるが、これらの酵素を本来の反応とは逆向きの反応に対して働かせてペプチド化合物の生成に用いようとするのは、酵素触媒の特徴である、

(1) 常温、常圧、中性付近の pH 領域という極めて穏和な条件で反応が進行するので、有機合成と比較すると所要エネルギーをかなり節約できること、

(2) 基質分子に対する厳密な選択性（基質特異性、立体特異性）を持ち、基質分子の特定の部位に対して特定の反応のみを触媒するので、副生成物の混入を少なくすることができること、

* 応用反応化学科、**京都大学工学部高分子化学科

などの点から注目され、多くの研究が行われている[1-4]。いくつかにおいては実用化されるに至っており、その例としては、合成甘味剤であるアスパルテームの前駆体の合成やヒトインシュリンの半合成などがある。

一方 Nelson と Griffin が、1916年に活性炭に吸着したインペルターゼがたまたま活性を長期にわたって保持し、しかも繰り返し使用が可能であることを見出したことにその由来をもつ生体触媒の固定化は、1960年代末から今日まで非常に多くの研究が行われてきている[3-6]。

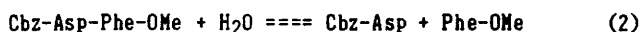
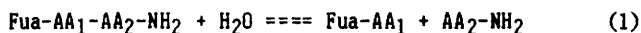
一般に生体触媒の固定化方法としては、

- (1) 共有結合、イオン結合、物理的吸着、生化学的親和力などにより不溶性の担体に固定化する担体結合法、
- (2) 生体触媒同士をグルタルアルデヒドのような二官能性、あるいは多官能性試薬で架橋して不溶化させる架橋法、
- (3) 低分子化合物を重合あるいは会合させることによって生じる高分子ゲル（格子型）、マイクロカプセル、リボソームに生体触媒を包み込んだり、中空繊維（ホローファイバー）や限外濾過膜に生体触媒を閉じ込める包括法、
- (4) 上に示した(1)～(3)を適当に組み合わせた複合法、

がある。それぞれ長所と短所を合わせ持っているが、固定化することによって酵素の安定性が増大されることと、触媒の再利用が可能となることはとくに利用価値があると考えられている。また、固定化生体触媒を用いて生化学反応を連続的に行わせる場合には、有機溶媒を反応系に導入して基質や生成物を溶解させる必要のあることがあるので、有機溶媒中での固定化酵素による反応についても多くの研究が行われており[7]、固定化の方法や固定化担体の性質によっては、有機溶媒に対する抵抗性も増大することが報告されている。

本報告では、プロテアーゼとしてサーモライシン(Thermolysin) [EC 3.4.24.4]を取り上げ、遊離の酵素および固定化した酵素によるペプチド合成反応における諸因子の効果を検討した結果について、加水分解反応における結果と比較をしながら報告する。

ここで対象とした反応は、N-アシルアミノ酸とアミノ酸誘導体の縮合反応 (Eq. 1 と Eq. 2 の逆反応) である。



サーモライシンは、Bacillus thermoproteolyticus が産生する耐熱性の中性エンドプロテアーゼであり[8]、活性発現に必要な1個の亜鉛イオン (Zn^{2+}) と安定性などに関与している4個のカルシウムイオン (Ca^{2+}) を含んでいる金属プロテアーゼである。アミノ酸配列およびタンパク質の立体配置についてはかなり以前に明らかにされている[9]。反応機構に関する多くの研究[10]から、活性発現には Zn^{2+} と Glu-143、Asp-226、His-231 などが関与するとされている。

2. 実験

2. 1. 試薬

サーモライシンは大和化成(株)より入手した(Lot. T4KB31, T4KB32)。多孔性ガラスビーズ(pore 直径 $7.61\mu\text{m}$, pore 体積 $36\text{m}^2/\text{g}$, 200~400 mesh)は、和光純薬工業より購入した(FPG-700S, Lot. SDK8724)。固定化担体として用いたラテックスは、アクロレイン-スチレン共重合体であり、直径 $20\mu\text{m}$ のもの(AL-2000)である[11]。

緩衝剤として用いた4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes)、2-morpholinoethanesulfonic acid (Mes)、N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid (Taps)、tris(hydroxymethyl)aminomethane (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol, Tris)は、同仁化学研究所製、および和光純薬工業製のものを使用した。N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-glycine (Fua-Gly)、Fua-Phe、Fua-Gly-Leu-NH₂、Fua-Gly-Phe-NH₂、Fua-Phe-Leu-NH₂、Fua-Phe-Phe-NH₂は、文献[12]で使用されているものと同じものであり、それぞれ合成したものを使用した。L-Glycinamide (Gly-NH₂)、Leu-NH₂、Phe-NH₂、L-phenylalanine methyl ester (Phe-OMe)、N-carbobenzoxy-L-aspartic acid (Cbz-Asp)、N-acetyl-L-phenylalanine (Ac-Phe)は東京化成工業、SIGMA社、ペプチド研究所、半井化学薬品などから購入した。その他の試薬は市販の特級あるいはクロマトグラフ用のものを使用した。

2. 2. サーモライシン溶液の調製、および濃度測定

サーモライシン溶液は、水溶液のイオン強度を高くして酵素を溶解して調製するのが常法であるが、エチレングリコールを使用して調製する方法もある。前者は、10mM CaCl₂を含む緩衝液にKBr、またはNaBrを2~2.5M溶解してイオン強度を上げ、pHを調整したものにサーモライシンを溶解する方法であり、主に遊離酵素として使用する場合に用いた。後者は、10mg/mLのサーモライシン水溶液を調製しようとする場合、サーモライシン10mgにpH調整済みの緩衝液を0.1mL加え懸濁させたのち、エチレングリコールを0.1mL加えて50℃の温浴中にて攪拌する。完全に溶解したところで先の緩衝液を0.8mL加えることにより10%(V/V)エチレングリコール水溶液として調製した。この方法は、固定化時などに高いイオン強度になつては困る場合に用いた。この場合の注意点として、サーモライシンの粉末に直接エチレングリコールを加えるとサーモライシンが凝集してしまうことと、溶液を長時間低温で放置すると沈殿してくることである。また、どちらの方法でも1mLに20mgまではサーモライシンを溶解することができた。

サーモライシン濃度の測定は溶液の吸光度から求める方法を用いた。吸光係数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 61,100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とタンパク質含量67%をもとにして、分光光度計(日本分光 UVIDE610B)で測定した結果、および25℃、pH 6.1 (Hepes 0.1M)におけるFua-Gly-Leu-NH₂に対する $k_{\text{cat}}/K_M = 18,300\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [12-a] から計算して求めた。

2. 3. サーモライシンの固定化

2. 3. 1. ガラスビーズの場合

サーモライシンの多孔性ガラスビーズへの固定化は、 γ -アミノプロピルトリエトキシシランを介してグルタルアルデヒドで酵素を結合する方法を用いた[5-a]。

ガラスビーズを5%(V/V)硝酸中で1時間処理したのち充分に水洗し、これを200℃で2時間乾燥することによって付着している有機物を取り除いた。塩酸でpHを3~5に調整した10%(V/V)

アミノプロビルトリエトキシシラン水溶液 10mL に、ガラスビーズ 1gの割合で加え、75°Cで3時間時々攪拌しながら反応させたのち、十分に水洗した。このアミノシラン化したガラスビーズ 1gに 10倍量以上の 1%(V/V) グルタルアルデヒド水溶液 (pH 7.4) を加え、1時間反応させたのち水洗した。次に、50mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したのち、10mM CaCl_2 、2.5M KBrを含む 50mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) 10mL に 100mgのサーモライシンを溶かしたものを加えて、4°Cで一晩反応させた。反応終了後、0.5M の NaCl を含む 0.1M Hepes 緩衝液 (pH 7.4)、0.1M エタノールアミン水溶液 (pH 8.3)、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)、50mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) の順番で洗浄を繰り返し、湿潤状態で冷蔵保存 (4°C) した。固定化率は、濾液の吸光度から算出した結果、約55%であった。

2. 3. 2. ラテックスの場合

固定化担体として用いたラテックスはアルデヒド基を持つアクロレインを含んでいるので、そのまま酵素と反応させシッフ塩基を形成させることにより固定化した。

0.97 μM サーモライシン水溶液 (10%(V/V) エチレングリコール) 10mL (50mM Tris 緩衝液, pH 8.0) に 32mg/mL ラテックス粒子を含む懸濁水溶液を 2mL 加えて 4°Cで 20時間反応させたのち、限外濾過 (限外濾過器, TOYO Advantec, Model: UHP-25) を行なった。限外濾過膜としては、pore size 50nm (Millipore; Filter type: VM (Lot. N3K01010)) のものを使用し、0.1M Hepes 緩衝液 (pH 7.0) での洗浄を繰り返すことにより精製した。限外濾過時の濾液の吸光度から計算した結果、固定化率は約 75% であった。また、サーモライシンを固定化したのちの ラテックス懸濁水溶液は、45.2mg/mL となった。

2. 3. 3. 吸着による固定化

吸着固定化は、固定化担体上に酵素を沈着させることにより行なった [5-b]。固定化担体としては、ガラスビーズ (FPG-700S) を用いた。上に示したようにガラスビーズに付着している有機物を取り除き、それを蒸発皿もしくはペトリシャーレに広げた。ガラスビーズ 1mg に対して、0.3mg のサーモライシンを 10%(V/V) エチレングリコールを含む Hepes 緩衝液 (pH 7.0) 10 μL に溶解したものを全てのガラスビーズが湿るように加え広げた。その後、ガラスビーズがさらさらと動くようになるまで室温で乾燥させて目的物を得、それをそのまま縮合反応などに使用した。

2. 4. 反応の解析

2. 4. 1. 加水分解反応

振盪機付きの恒温槽中にて反応を行ない、反応中に反応混合溶液が蒸発するのを防ぐためにパラフィルムで試験管の口をシールした。緩衝液としては、pH 5.0~7.0 は Mes、pH 7.0~8.0 では Hepes、pH 8.0~9.0 は Taps を使用し、これは縮合反応においても同様である。

固定化系の反応では、pH調整を済ませ 10mM CaCl_2 を含む緩衝液 950 μL に、固定化サーモライシン (9~10mg) を加えて 37°Cの恒温槽中に浸し、反応混合溶液の温度が一定になるまで数分間放置した。そこへ 20mM 基質 DMSO 溶液 50 μL を加えることにより加水分解反応を開始させ、分析サンプルを HPLC にて分析した (後述)。

ラテックス系での反応初期速度は、分光光度計を使用して基質の減少を吸光度変化 ($\lambda=320\text{nm}$) で観測することにより求めた。

2. 4. 2. 縮合反応

同様に振盪機付きの恒温槽中にて反応を行ない、しかも縮合反応は長時間反応させるため、スクリーキャップ付きの試験管を使用して反応を行なった。

遊離のサーモライシンで縮合反応を行う場合は、反応容器として 1.5 μL のふた付きマイクロチューブ中に行なった。pH 調整を済ませた 10mM CaCl_2 と目的とする濃度の基質、Fua-Gly と Leu-NH₂、を含む緩衝液 (DMSO が反応系において 5% (V/V) 含まれる)、またはそこへ有機溶媒を加えたもの、0.49mLを37°Cの恒温槽中に浸し、反応混合溶液の温度が一定になるまで数分間放置した。そこへ目的とする濃度のサーモライシン溶液 10 μL を加えることにより縮合反応を開始させ、分析サンプルを HPLC にて分析した。なおアスパルテームの前駆体の合成の場合は、スクリーキャップ付きの試験管を使用して縮合反応を行なった。

固定化系ではpH 調整を済ませた 10mM CaCl_2 と 100mM アミノ基質を含む緩衝液 (Phe-NH₂ の場合は DMSO が 10%(V/V)含まれる) 200 μL に、MeCN 750 μL 、および固定化サーモライシン (10mg) を加えて 37°Cの恒温槽中に浸し、反応混合溶液の温度が一定になるまで数分間放置した。金属変換を行う場合には、最終的に先に示した濃度になるように予め緩衝液中に含ませておき、恒温槽中で 1時間放置した。そこへ 20mM アシル基質 DMSO 溶液 50 μL を加えることにより縮合反応を開始させ、分析サンプルを HPLC にて分析した。

また、酢酸エチルやクロロホルム中にて縮合反応を行う場合には、両基質ともその有機溶媒に溶解して行なった。

2. 5. HPLC分析

反応混合液を特定時間に50 μL 分取し、それをHPLC の溶離液 950 μL に加えて反応を停止させた。HPLC 溶離液は、基質や生成物により MeCNとリン酸水溶液の割合を変えた。固定化系では、その分析サンプルをメンブランフィルター (Millipore, Filter type: HV, Pore size 0.45 μm) で濾過するか Millipore 製パーソナル遠心機 (XX42 CFO 60, 6,400rpm, 2,000G) で分離した上澄み液を分析した。

分析に使用した HPLC は、島津製 LC-6Aであり、検出器には同じく島津製のSPD-6Aを使用し、クロマトパック C-R3A を接続して記録した。カラムには逆相カラムの Cosmosil 5C18-P (4.6 ϕ \times 150mm) を、ガードカラムには Cosmosil 10C18-P (4.6 ϕ \times 50mm) を使用した。測定波長は、発色基が Fua のとき 305nm、Cbz のとき 254nm、流速は 1.0mL/min の条件で行なった。定量は、C-R3Aで得られたピーク面積から求めた。

溶離液には、メンブランフィルター (FUJI FILM Micro Filter, Type FM-45, 0.45 μm) で濾過したリン酸水溶液と液体クロマトグラフ用溶媒の MeCN の混合物を減圧脱気して使用した。リン酸水溶液は、pH をアミド基質の場合は 3.0 に、エステル基質の場合には 2.5に調整したものを使用した。

3. 結果と考察

3. 1. 遊離の酵素

Figure 1 は、遊離サーモライシンによりペプチド合成反応を行なったときの pH依存性を調べたものである。アシル基質として Fua-Gly (25mM)、アミノ基質としては Leu-NH₂ (25mM) を用い、

酵素濃度が $4.0\mu\text{M}$ の条件で反応を行なわせた。●、○ および ▲ は、それぞれ 2分、10分、および 24時間ペプチド合成反応を行なったときの結果であり、生成物である Fua-Gly-Leu-NH₂ の合成収率で表してある。

サーモライシンの加水分解活性が高い pH 6 と pH 7 では、反応開始初期の合成速度は速いようだが、pH 6 の場合は時間の経過と共にかなり速く合成収率が減少しており、pH 7 の場合はほぼ一定であるが僅かに減少している。それに対して pH 8 と pH 9 では、合成収率は最初低いが次第に上昇し、24時間後には、pH 8のときに最も高い合成収率が得られた。酵素の加水分解活性が高い pH 領域では、ペプチド合成活性自体も高いと考えられるが、生成物を再分解してしまうために、最終的には少し至適 pH からずれたところで高収率が得られたと思われる。

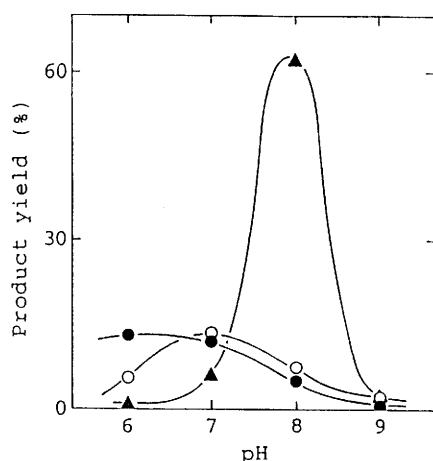


Fig.1.
pH Dependence of peptide synthesis by thermolysin.
[Fua-Gly]=25mM, [Leu-NH₂]=25mM, [enzyme]= $4.0\mu\text{M}$ reaction time; 2 min.(●), 10 min.(○) and 24 h(▲), 37°C.

Table 1. Peptide Synthesis by Thermolysin.*

[Leu-NH ₂] (mM)	Product yield (%)	
	12hr	26hr
5.0	11	3.7
10	19	6.0
20	36	18
50	47	26
100	39	27

* [Fua-Gly]=1mM, [enzyme]= $1\mu\text{M}$, pH 7.0, 37°C.

Table 1 は、遊離サーモライシン触媒でペプチド合成反応を行うにあたり、アシル基質濃度を一定にし、それに対してアミノ基質の濃度を変化させて行なった結果を示したものである。アシル基質として Fua-Gly (1.0mM)、アミノ基質として Leu-NH₂ (5~100mM) を使い、酵素濃度 $1.0\mu\text{M}$ で、pH 7.0 の条件で反応を行わせ、生成された Fua-Gly-Leu-NH₂ の合成収率で表してある。

12時間縮合反応を行なった場合、アミノ基質の濃度が 50mM 程度までは濃度の増加に従って次第に合成収率の増加がみられている。しかし、それ以上のアミノ基質が存在する場合は、次第に減少している。また、26時間縮合反応を行なった場合では、どの濃度においても12時間反応したと

Table 2. Influence of Temperature on the Peptide Synthesis by Thermolysin.*

Temp. (°C)	Product yield (%)		
	30min	1hr	2hr
15	66	63	62
25	70	69	68
37	67	68	67
50	64	63	61
70	10	7.3	1.6

* [Fua-Gly]=1mM, [Leu-NH₂]=20mM, [enzyme]=1μM, pH 7.0.

きよりも 合成収率の減少が生じているが、12時間反応を行なったときにみられた 50mM以上での合成収率の減少は生じていない。このことから、縮合反応の初期の段階ではアミノ基質の濃度が高いほど縮合反応も速く進んでおり、その後次第に生成物の加水分解反応が生じているのではないかと考えられる。以後の縮合反応においては、アミノ基質の濃度がアシル基質に対して過剰に存在する条件において行うことにした。

Table 2 は、遊離サーモライシン触媒でペプチド合成反応を行なったときの温度依存性を調べたものである。アシル基質として Fua-Gly (1.0mM)、アミノ基質としては Leu-NH₂ (20mM) を用いて、酵素濃度が 1.0 μM で、pH 7.0の条件で反応を行わせ、その反応の生成物である Fua-Gly-Leu-NH₂ の合成収率としてまとめた。

15~50°Cの温度での場合においては、大きな合成収率の変化はみられなかったが、70°Cでの場合には、他の温度で行なったときに得られた合成収率の 1/4 以下にまで減少している。この酵素は 70°C付近までは安定であり加水分解活性が高くなることが知られているが[13]、加水分解活性が高すぎる条件、この場合 50~70°C の温度では生成物の再分解が生じているためにジペプチドアミドの合成収率が低くなっていると考えられ、ある程度加水分解活性が低い温度 (25, 37°C程度) において、高い合成収率が得られることが分かった。

Figure 2 は、遊離サーモライシン触媒でペプチド合成反応を行なったときの、有機溶媒の種類、およびその濃度による影響について調べてみたものである。アシル基質として Fua-Gly (1.0mM)、アミノ基質として Leu-NH₂ (10mM) を用い、サーモライシンの濃度が 0.23 μM で pH 7.0の条件において 6時間反応を行なった。有機溶媒としては、水溶性である MeCN (●)、Dioxane (○)、DMSO (▼) を取りあげた。

有機溶媒の含量が 50%(V/V) 付近までは、合成収率が有機溶媒の含量に従って次第に増加しているが、それ以上になると今度は次第に減少している。この結果からは、ここで用いた 3種の有機溶媒の中で、MeCNを添加したときが最も好ましい結果を得られることが分かった。酵素濃度が低いので合成収率もさほど好くないが、MeCN 60%(V/V) のとき最も高い値が得られている。また、DMSO における合成収率が他の 2種の有機溶媒に比べて低い値しか得られなかったのは、DMSO の大きな極性に依存するところが大きいと考えられる。

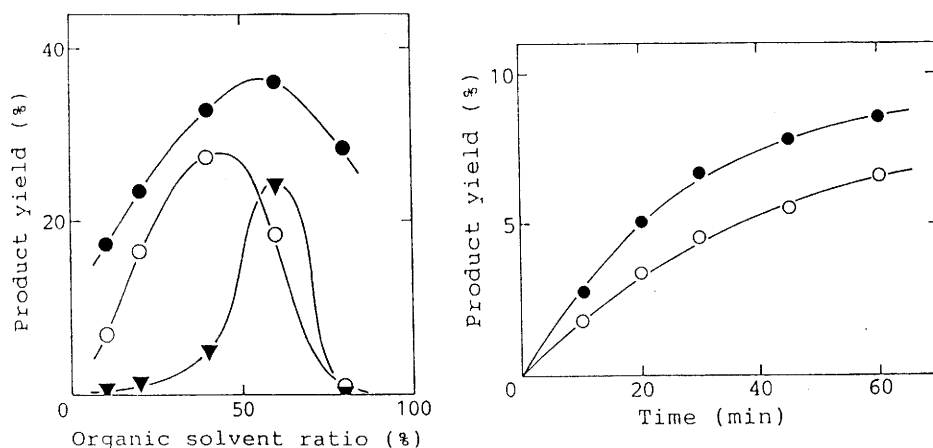


Fig.2. Peptide synthesis by thermolysin in the presence of various organic solvent.
 [Fua-Gly]=1mM, [Leu-NH₂]=10mM, [enzyme]=0.23μM,
 reaction time = 6 h, pH 7.0, 37°C.
 MeCN (●), Dioxane (○), DMSO (▼).

Fig.3. Synthesis of Aspartame Precursor by Thermolysin.
 [Cbz-Asp]=10mM (●) or 20mM (○), [Phe-OMe]=40mM,
 [enzyme]=5.0μM, pH 6.5, 40°C.

3. 2. アスパルテーム前駆体の合成

サーモライシンは、アスパルテームの前駆体である Cbz-Asp-Phe-OMe の合成に使用され、多くの研究が行なわれている[2,3]。中西らは、アンバーライトへ固定化したサーモライシンを酢酸エチル中、および水と酢酸エチルの二相系においてその合成反応の触媒をさせており、どちらでも高収率で目的物を得ている[3-a]。また、最近彼らは、二相系での合成反応の解析を詳細に行い、アシル成分、例えば Cbz-Asp に対してサーモライシンが productive な結合部位と non-productive な結合部位の二つを有するという機構を提唱している [2-a,14]。

Figure 3 は、遊離サーモライシン触媒で、アスパルテームの前駆体の合成反応を、アシル基質とアミノ基質の濃度比を変えて行なったときの合成収率に対する時間変化を示したものである。

アシル基質として Cbz-Asp (10mM (●)、20mM (○))、アミノ基質として Phe-OMe (40mM) を用い、酵素濃度 5.0μM、pH 6.5、40°Cの条件で行なった。

アシル基質の濃度が 10mM のときの方が 20mM のときよりも良い結果を得ているが、合成収率はアシル基質に対する生成物の量として表してあるので、実際に合成されたアスパルテームの前駆体の収量では、20mM で行なったときの方が多くなることになる。しかし、Fua-Gly-Leu-NH₂の合成反応などで観られたのと同様に、アシル基質に対するアミノ基質の濃度比が大きくなるほど合成収率(仕込量に対する生成物の割合)が良くなることが分かった。

3. 3. ガラスビーズ固定化サーモライシン

ガラスビーズ固定化サーモライシンの量を2~20mg(wet)に変化させて、pH 7.0 の条件において Fua-Gly-Leu-NH₂ の加水分解反応を行なったところ、固定化酵素の量に従って加水分解率が高くなったが、ここで用いた方法では、5mg/mL以上の範囲ではその増加率は緩くなった。そこである程度反応速度が速く、しかもなるべく使用する酵素量を少なくするために、10mg(wet)程度の固定化酵素を反応系(1mL)に加えることにした。

Figure 4 は、ガラスビーズ固定化サーモライシン触媒でペプチド合成反応を行なったときの、有機溶媒の種類、およびその濃度による影響について調べたものである。アシル基質として Fua-Gly (1.0mM)、アミノ基質として Leu-NH₂ (10.0mM) を用い、有機溶媒としては、水溶性である MeCN (●)、Dioxane (○)、DMSO (▼) を取りあげて、pH 7.0 で 6時間反応を行なった。

有機溶媒の割合が 60%(V/V) 付近までは 3種の溶媒とも同様な合成収率を示し、有機溶媒含率の上昇に従って次第に増加しているが、それ以上になると MeCN とジオキサンの場合はまださらに増加していくのに対して、DMSOの場合は逆に急激に減少している。以後反応系に有機溶媒を添加する場合は、遊離のサーモライシンの結果も考慮して MeCN を添加することにした。

3. 4. ラテックス固定化サーモライシン

Figure 5 は、ラテックスに固定化したサーモライシンで、加水分解反応を行なったときの pH 依存性を調べてみたものである。基質としては Fua-Gly-Leu-NH₂ (9.9 μ M) を用い、固定化サーモライシン (10 μ L) を加えて反応を行わせ、得られた反応初期速度をで表してある。

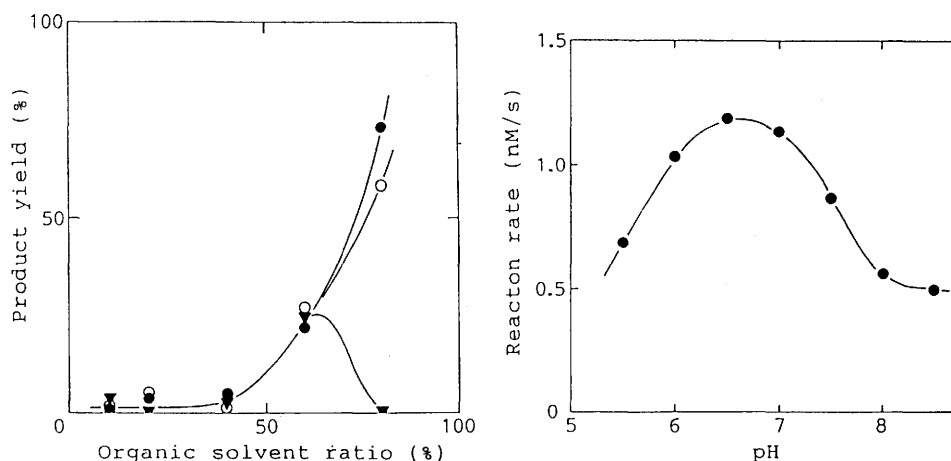


Fig.4. Peptide synthesis by immobilized thermolysin in the presence of various organic solvent.
[Fua-Gly]=1mM, [Leu-NH₂]=10mM, [Im-TLN]=10mg/mL
reaction time = 6 h, pH 7.0, 37°C,
MeCN (●), Dioxane (○), DMSO (▼).

Fig.5. pH Dependence of the hydrolysis by latex-immobilized thermolysin.
[Fua-Gly-Leu-NH₂]=9.9 μ M, 0.02mL/mL Im-TLN, 37°C.

Table 3. Hydrolysis by Latex-Immobilized Thermolysin.*

Substrate	Product yield (%)	
	native	Ac-Phe-
Fua-Gly-Leu-NH ₂	7.2	15
Fua-Gly-Phe-NH ₂	17	44
Fua-Phe-Leu-NH ₂	---	1.6
Fua-Phe-Phe-NH ₂	42	46

* reaction time = 1 min. pH 7.0, [substrate] = 1mM, [Im-TLN] = 0.02mL/mL.

ラテックスに固定化したサーモライシンでの、加水分解反応における至適 pH は約 6.5~7.0 付近であり、遊離サーモライシンによる結果よりも僅かにアルカリ性側へ移動していると思われる。

Table 3 は、修飾していない固定化酵素と N-Ac-Phe-ONSu でアシル化した固定化酵素に、いくつかのジペプチドアミドの加水分解反応を pH 7.0 で 1 分間触媒させたときの結果をまとめたものである。

基質が Fua-Gly-Leu-NH₂、および Fua-Gly-Phe-NH₂ の場合においては、N-Ac-Phe-ONSu でアシル化した固定化酵素によるものの方が修飾していないものよりも 2 倍以上の加水分解率が得られているが、基質が Fua-Phe-Leu-NH₂ と、Fua-Phe-Phe-NH₂ の場合においては、アシル化した固定化酵素と修飾していないものとでさほど差が生じていない。また、加水分解反応における反応作用位置のアミノ基側のアミノ酸が Phe の場合は、Leu の場合よりもかなり反応速度が速いと思われる。ガラスビーズに固定化したものではこのような傾向はみられなかったが、加水分解反応作用位置のアミノ基側のアミノ酸 (Leu、Phe) によって差が生じることは、担体としてラテックスを用いたことによる影響と思われる。

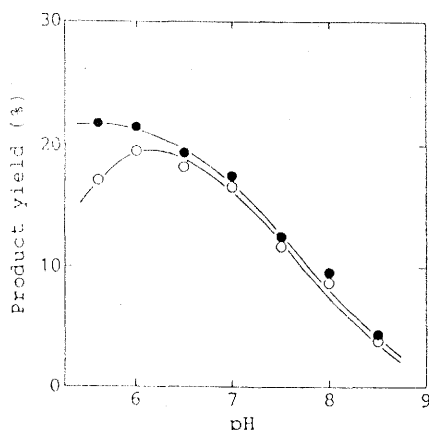


Fig.6. pH Dependence of the peptide synthesis by Latex-immobilized thermolysin. [Fua-Gly]=1mM, [Leu-NH₂]=20mM, reaction time = 4h. 0.02mL/mL native (●) and Ac-Phe-acylated (○) Im-TLN.

Figure 6 は、修飾していない固定化酵素と、N-Ac-Phe-ONSu でアシル化した固定化酵素で、ペプチド合成反応を行なったときの pH 依存性を調べたものである。アシル基質として Fua-Gly、アミノ基質としては Leu-NH₂ を用いて、4 時間縮合反応を行わせた。● と ○ は、それぞれ修飾して

ない、またアシル化したラテックス固定化サーモライシンで行なったときの結果であり、生成物である Fua-Gly-Leu-NH₂ の合成収率で表してある。

ここで得られた結果は、遊離系、およびガラスビーズ固定化系で得られた結果とかなり異なり、修飾してないものの場合至適 pHが 5.5 付近とかなり酸性側へ移動しており、N-Ac-Phe-ONSu でアシル化したものによる場合は僅かにアルカリ性側で、pH 6.0 付近となっている。また、N-Ac-Phe-ONSu でアシル化したものは修飾してないものよりもラテックス粒子の含量が少ないので (ca. 80%)、単純計算すると修飾した酵素の方が合成収率で高くなることになるが、詳細は今後の研究を待たねばならない。

3. 5. 吸着固定化サーモライシン

担体に吸着固定化した酵素によって合成反応を行かせた場合において良い結果が得られたと報告されており [5-b]、ここではガラスビーズに吸着によってサーモライシンを固定化し、その吸着固定化サーモライシンによる非水溶性の有機溶媒中でのペプチド合成反応を行なった。

Table 4. Peptide Synthesis by Thermolysin Absorbed on Glass Beads in Various Organic Solvent.*

Substrate	Organic solvent	Product yield (%)
Fua-Gly + Phe-NH ₂	Ethyl acetate	32
	Chloroform	15

Fua-Phe + Phe-NH ₂	Ethyl acetate	49
	Chloroform	3.5

* reaction time = 6 hours, [Fua-Gly or Fua-Phe]=1mM, [Phe-NH₂]=25mM, [Im-TLN]=5mg/mL.

Table 4 は、ガラスビーズに吸着によって固定化したサーモライシンで、非水溶性の有機溶媒である酢酸エチル、またはクロロホルム中において、いくつかの基質に対してペプチド合成反応を行なったときの結果を表にまとめたものである。アシル基質として Fua-Gly と Fua-Phe (1.0mM)、アミノ基質としては Phe-NH₂ (25mM) を用い、6時間縮合反応を行わせ、生成物であるジペプチドアミドの合成収率として表してある。

アシル基質が Fua-Gly、Fua-Phe のどちらの場合でも酢酸エチル中において行なったときの合成収率の方が、クロロホルム中での場合よりも高い値が得られている。また、酢酸エチル中ではアシル基質が Fua-Gly よりも Fua-Phe である方が高い合成収率を示し、逆にクロロホルム中においては Fua-Phe よりも Fua-Gly の方が良い値を示しており、若干ではあるが、反応系中の有機溶媒によって酵素の基質選択性が変わっている。

ガラスビーズにグルタルアルデヒドで固定化したサーモライシンで行なった結果よりも、ここで用いた吸着によって固定化したサーモライシンでのときの方が、高い合成収率を得られることが分かった。

引用文献

- 1) Y. Isowa, M. Ohmori, M. Sato and K. Mori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 2766 (1977); K. Morihara, H. Tsuzuki and T. Oka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 95 (1978); K. Inouye, K. Watanabe, K. Morihara, Y. Tochino, T. Kanaya, J. Emura and S. Sakakibara, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 751 (1979); A. Leonhardt, F. Gutzler and G. Wegner, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **3**, 461 (1982); S. I. Wayne and J. S. Fruton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 3241 (1983); H. D. Jakubke, P. Kuhl and A. Konnecke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 85 (1985).
- 2) a) K. Nakanishi, Y. Kimura and R. Matsuno, *Eur. J. Biochem.*, **161**, 541 (1986).
 b) Y. Isowa, M. Ohmori, T. Ichikawa, K. Mori, Y. Nonaka, K. Kihara, K. Oyama, H. Satoh and S. Nishimura, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 2611; K. Oyama, K. Kihara and Y. Nonaka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1981**, 356; H. Ooshima, H. Mori and Y. Harano, *Biotechnol. Lett.*, **7** (11), 789 (1985).
- 3) a) K. Nakanishi, T. Kamikubo and R. Matsuno, *BIO/TECHNOLOGY*, **3**, 459 (1985).
 b) K. Oyama, S. Nishimura, Y. Nonaka, K. Kihara and T. Hashimoto, *J. Org. Chem.*, **46**, 5241 (1981).
- 4) J. Tramper, *Trends in Biotechnology*, **3**, 45 (1985).
- 5) a) A. Kohsaka, *Rinsho Kensa*, **22**, 1186 (1978).
 b) R. Z. Kazandjian and A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5448 (1985).
 c) R. Epton, J. V. McLaren and T. H. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 418 (1973); S. Fukushima, T. Nagai, K. Fujita, A. Tanaka and S. Fukui, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1465 (1978); A. Koennecke, M. Haensler, V. Schellenberger and H. D. Jakubke, *Monatsch. Chem.* **114**, 433 (1983); M. Kumakura and I. Kaetsu, *Helv. Chim. Acta*, **66**, 2044-2048 (1983); S. Fukui and A. Tanaka, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **29**, 1 (1984); M. Kumakura, I. Kaetsu and T. Kobayashi, *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 23 (1984).
- 6) S. Kunugi, Y. Morikawa, M. Ishida and Y. Nakamura, *Polym. J.*, **19**, 269 (1987).
- 7) A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, K. Martinek and I. V. Berezin, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1351 (1977); G. A. Homandberg, J. A. Mattis and M. Laskowski, Jr., *Biochemistry*, **17**, 5220 (1978); K. Nilsson and K. Mosbach, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1146 (1984); G. Carrea, *Trends in Biotechnol.*, **2**, 102 (1984); R. Z. Kazandjian, J. S. Dordick and A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 417 (1986); A. M. Klibanov, *CHEMTECH*, **1986**, 354.
- 8) S. Endo, *J. Ferment. Technol.*, **40**, 346 (1962).
- 9) a) K. Titani, M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, K. A. Walsh and H. Neurath, *Nature N.B.*, **238**, 35 (1972).
 b) B. W. Matthews, J. N. Jansonius, P. M. Colman, B. P. Schoenborn and D. Dupourque, *ibid.* **238**, 37 (1972).

- c) P.M.Colman, J.N.Jansonius and B.W.Matthews, *J.Mol.Biol.*, **70**, 701 (1972); B.W. Matthews, P.M.Colman, J.N.Jansonius, K.Titani, K.A.Walsh and H.Neurath, *Nature N.B.*, **238**, 41 (1972).
- 10) a) F.S.Kennedy, H.A.O.Hill, T.A.Kaden and B.L.Vallee, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **48**, 1533 (1972); T.A.Kaden, B.Holmquist and B.L.Vallee, *ibid.*, **46**, 1654(1972).
 b) W.R.Kester and B.W.Matthews, *Biochemistry*, **16**, 2506 (1977).
 c) A.F.Monzingo and B.W.Matthews, *Biochemistry*, **23**, 5724 (1984); D.G.Hangauer, A. F.Monzingo and B.W.Matthews, *Biochemistry*, **23**, 5730 (1984).
 d) S.Blumberg, *Biochemistry*, **18**, 2815 (1979); S.Blumberg and B.L.Vallee, *Biochemistry*, **14**, 2410 (1975).
 e) Y.Ohta, H.Nakamura and T.Samejima, *J.Biochem.(Tokyo)*, **72**, 521(1972); B.Holmquist, S.Blumberg and B.L.Vallee, *Biochemistry*, **15**, 4675 (1976).
 f) S.Blumberg, B.Holmquist and B.L.Vallee, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **51**, 987 (1973); Y.Burstein, K.A.Walsh and H.Neurath, *Biochemistry*, **13**, 205 (1974); S. Blumberg, B.Holmquist and B.L.Vallee, *Isr.J.Chem.*, **12**, 643 (1974).
 g) B.Holmquist and B.L.Vallee, *J.Biol.Chem.*, **149**, 4601 (1974); J.Riikola, N.Paberit, M.Pank and A.Aaviksaar, *Eesti NSV Tead. Akad.Toim., Keem.*, **33**, 257 (1984); B.Holmquist and B.L.Vallee, *Biochemistry*, **15**, 101 (1976).
 f) B.Holmquist, T.A.Kaden and B.L.Vallee, *Biochemistry*, **14** (7), 1454-1461 (1975).
- 11) H.Kitano, K.Nakamura, M.Fukuda, N.Ise and S.Kunugi, 3rd Polymer Microspheres Symposium, Fukui Japan, Nov.8, 1984, Abstracts, p.131.
- 12) a) S.Kunugi, H.Hirohara and N.Ise, *Eur.J.Biochem.*, **124**, 157 (1982).
 b) M.Fukuda and S.Kunugi, *Eur.J.Biochem.*, **142**, 565-570 (1984).
- 13) G.Voordouw and R.S.Roche, *Biochemistry*, **14**, 4659,4667 (1975); H.G.Brittain, F.S. Richardson and R.B.Martin, *J.Am.Chem.Soc.*, **98**, 8255 (1976); F.W.Dahlquist, J.W. Long and W.L.Bigbee, *Biochemistry*, **15**, 1103 (1976); G.Voordouw, C.Milo and R.S. Roche, *Biochemistry*, **15**, 3716 (1976).
- 14) K.Nakanishi and R.Matsuno, *Eur.J.Biochem.*, **161**, 533 (1986).

